ПАРАЗИТОЛОГИЯ, III, 6, 1969

УДК 576.895.77

ОБ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВАХ СУБСТРАТОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ ЛИЧИНОК I И III СТАДИЙ ПОДКОЖНОГО ОВОДА СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ

К. А. Бреев и Г. Н. Обрежа

Зоологический институт АН СССР и Отдел микробиологии
Института экспериментальной медицины АМН СССР

С помощью реакции пассивной гемагглютинации по Бойдену и Ставицкому показана неоднородность антигенных свойств гемолимфы личинок III стадии и водно-солевого экстракта из свежеотродившихся личинок I стадии подкожного овода северного оленя.

Как известно, личинки I стадии подкожных оводов родов *Hypoderma*, *Oedemagena*, *Crivellia*, мигрирующие в соединительной ткани организма хозяина, резко отличаются по образу жизни от личинок II и III стадий, живущих в подкожных соединительнотканных капсулах и изолированных от непосредственного контакта с организмом хозяина толстой стенкой капсулы. Основываясь на этих и некоторых других фактах, Бисли (1968) считает, что иммунитет животных к подкожным оводам связан прежде всего с реакциями организма хозяина на секреты и экскреты личинок I стадии, выделяемые еще до выхода последних под кожу спины. Тогда возникает вопрос о степени идентичности антигенных свойств субстратов, получаемых из личинок различных стадий. Вопрос этот имеет принципиальное значение, так как если эти свойства неидентичны, то с целью получения антигенных препаратов как для иммунологической диагностики, так и для изучения возможностей создания искусственного иммунитета к заражению животных оводами необходимо пользоваться субстратами только из личинок I стадии.

Наибольший интерес представляют при этом белковые субстраты из наиболее молодых личинок I стадии. Дело в том, что уже в середине периода развития этой стадии бо́льшую часть объема тела личинки начинает занимать средняя кишка, наполненная высокотоксичным веществом с резко выраженными гистолитическими свойствами, служащим в дальнейшем для образования свища (Оно, 1938; Beesley, 1965). Поэтому, как не без основания считает Бисли (1968), вряд ли справедливо предположение, что такой поздно появляющийся агент вызывает иммунитет к подкожнооводовой инвазии.

Чтобы решить вопрос о степени идентичности антигенных свойств белковых субстратов из личинок I и III стадий подкожных оводов, нами были поставлены опыты с личинками подкожного овода северного оленя (*Oedemagena tarandi* L.), потому что именно у этого вида нам удалось собрать относительно большое количество личинок I стадии сразу после выхода их из яиц.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Основным материалом для опытов служили очищенная от клеточных элементов гемолимфа взрослых личинок III стадии и экстракт в физиологическом растворе из личинок I стадии, помещавшиеся в раствор сразу после выхода из яиц и мацерированных многократным повторным замораживанием и оттаиванием.

Методы получения личинок I стадии и гемолимфы личинок III стадии изложены в статье Бисли и Бреева (1969). Всего было получено 1358 живых, свежеотродившихся личинок I стадии. Поскольку их размеры очень невелики (длина 0.75 мм, ширина 0.1 мм, объем тела 0.004—0.006 куб. мм), общий объем всех собранных личинок составил всего около 5.5 $мм^3$, и трудно было подобрать другие методы приготовления препарата для определения антигенных свойств. Но и при таком методе удалось получить всего около 0.30 мл водно-солевого экстракта в двух порциях по 0.15 мл. В первой из них, где находилось около 500 личинок, концентрация белка, определенная методом Лаури, составляла 23 γ в 0.01 мл, во второй (800 личинок) — 57 γ в 0.01 мл.

Полученные количества белкового субстрата оказались слишком незначительными, чтобы можно было установить идентичность или неидентичность антигенов из личинок I и III стадии обычными методами.

Первоначально была сделана попытка получить ответ методом диффузии в геле (реакция Ухтерлони). У морских свинок вызывали появление специфических антител трехкратным внутрибрюшинным введением по 0.5 мл нативной гемолимфы личинок III стадии *O. tarandi* с трехдневными интервалами. При реакции сыворотки крови таких свинок с соответствующим антигеном были получены четкие линии преципитации. Однако, когда в качестве антигена был применен экстракт из личинок I стадии, линии преципитации отсутствовали. Они отсутствовали и при сопоставлении этим методом гемолимфы личинок III стадии с сывороткой крови свинки, которой однократно был введен экстракт из примерно 700 личинок I стадии (Бисли и Бреев, 1969).

Тем не менее отрицательный результат в данном случае еще не свидетельствовал о неидентичности антигенов, поскольку концентрация белка в используемых препаратах была резко различна. В гемолимфе личинок III стадии она составляла 21 мг/мл, а в экстракте из личинок I стадии всего 2.3 мг/мл. Следовательно, требовались иные, более тонкие методы для ответа на поставленный вопрос.

Как известно, одним из наиболее чувствительных иммунологических методов является реакция пассивной гемагглютинации по Бойдену и Ставицкому (Boyden, 1951; Stavitsky, 1954; Софронов, 1964; Михкла, 1965). Сущность ее заключается в использовании способности эритроцитов, предварительно обработанных слабым раствором танниновой кислоты, адсорбировать на себе антигены, имеющие белковую природу. Если смешать нагруженные антигеном эритроциты со специфической для данного антигена антисывороткой, то эритроциты агглютинируются. Однако агглютинация тормозится, если до внесения эритроцитов к антисыворотке добавляют специфический антиген. Сопоставляя концентрации антигенов, вызывающих торможение реакции гемагглютинации, можно вывести заключение о степени их идентичности.

В опытах были использованы бараньи формалинизированные эритроциты (Weinbach, 1958; Софронов, 1964). В качестве антигена для их нагрузки использовали гемолимфу личинок III стадии *O. tarandi* в концентрации 0.3 мг белка на 1 мл 3% взвеси эритроцитов, обработанных равным объемом танниновой кислоты в концентрации 1 : 20 000. Нагрузку эритроцитов проводили при pH 6.4, температуре 37° в течение 30 минут. Была использована антисыворотка, полученная указанным выше способом (Бисли и Бреев, 1969).

Сначала в реакции пассивной гемагглютинации определили титр антисыворотки добавлением 0.1 мл 3% взвеси нагруженных эритроцитов к 0.5 мл антисыворотки, взятой в различных разведениях с коэффициентом 2. Все разведения делали на 0.9% растворе NaCl, содержащем 0.5% нормальной кроличьей сыворотки.

Для выявления количества антигена к убывающим его разведениям (с коэффициентом 2) добавляли равный объем антисыворотки так, чтобы получить концентрацию антител, близкую к титру сыворотки (1 : 20 000). После смешения и экспозиции в течение 15 минут при комнатной температуре добавляли нагруженные эритроциты и учитывали реакцию через 2 часа инкубации при комнатной температуре (предварительный учет), а затем через 18 часов инкубации при +4° (окончательный учет). Результаты реакции оценивали по четырехкрестной системе: положительной реакцией считали полную задержку агглютинации нагруженных эритроцитов. Характер антигена определяли на основании его способности тормозить агглютинацию при разных разведениях исследуемого белкового субстрата. Учитывали последнее разведение антигена, дающее полную задержку агглютинации нагруженных эритроцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как показано в таблице, гемолимфа личинок III стадии, будучи разведена так, что содержание белка составляло 8.2 γ/мл (что соответствовало разведению исходной гемолимфы 1 : 2560), полностью тормозила способность антисыворотки к этому антигену агглютинировать нагруженные эритроциты. В то же время экстракт из личинок I стадии, содержащий эквивалентные количества белка, агглютинацию не тормозил. Торможения не наступало даже в том случае, когда концентрация белка в экстракте из личинок I стадии достигала 1050 γ/мл, т. е. в 128 раз превышала тормозящую дозу антигена личинок III стадии.

Полученный результат позволяет полагать, что личинки III стадии *O. tarandi* существенно отличаются по своей антигенной характеристике от личинок I стадии. Для окончательного ответа на этот вопрос необходимо получить антисыворотку к антигенам личинок I стадии и поставить перекрестные опыты.

Результаты этого исследования совпадают с упомянутыми выше результатами опытов Бисли и Бреева (1969). Наши данные имеют то преимущество, что использованная серологическая реакция значительно более чувствительна по сравнению с реакцией преципитации в геле (Михкла, 1965).

Очевидно, что как при оценке результатов проведенных работ, так и при дальнейших исследованиях явлений иммунитета к подкожным оводам следует учитывать весьма вероятную неоднородность антигенных свойств субстратов, получаемых из личинок I и последующих стадий развития.

Авторы выражают искреннюю признательность заведующему Отделом микробиологии, академику АМН СССР, профессору В. И. Иоффе и заведующему лабораторией иммунологии Института экспериментальной медицины АМН СССР, доктору

Торможение реакции пассивной гемагглютинации с иммунсывороткой против гемолимфы личинок III стадии этим антигеном и антигеном из личинок I стадии

Антигены	Количество белка в (1 мл) «тормозящего» субстрата (в мкг)									Антисыворотка 1 : 20000 + + физиологический раствор
	1050	525	262	131	66	33	16.5	8.2	4.1	
Экстракт личинок I стадии . .	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Гемолимфа личинок III стадии	−	−	−	−	−	−	−	+	+++	++++

медицинских наук Б. Н. Софронову за предложение использовать реакцию пассивной гемагглютинации, предоставление возможности поставить эти опыты и консультации; ст. научному сотруднику Института цитологии АН СССР Н. М. Несветаевой за анализы содержания белка в исследуемых субстратах; ст. лаборанту А. Т. Кирьяковой и лаборанту Зоологического института АН СССР В. З. Белинской за большую помощь в трудоемкой работе по получению личинок I стадии.

Литература

Бисли В. Н. 1968. Хозяино-паразитные отношения при заражении подкожными оводами крупного рогатого скота. Паразитол., 2 (3) : 202—207.

Бисли В. Н. и Бреев К. А. 1969. Серологические реакции морских свинок на личинок и экстракты из личинок подкожных оводов — Oedemagena tarandi L. и Hypoderma bovis De Geer. Паразитол., 3 (5) : 472—477.

Михкла С. К. 1965. Сравнительная чувствительность некоторых иммунологических методов определения антител. Бюлл. эксп. биол. и мед., 60 (9) : 122—124.

Софронов Б. Н. 1964. О механизме и использовании реакции Бойдена. Лабор. дело, 9 : 542—545.

Beesley W. N. 1965. Recent work on the ox warble-flies (Hypoderma). The Veterin. Bull., 35 (1) : 1—6.

Boyden S. V. 1951. The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J. Experim. Med., 93 : 107—120.

Ono S. 1938. Studies on warble-flies of Manchuria and Inner Mongolia. Kitasato Arch., 15 (3) : 199—246.

Stavitsky A. B. 1954. Micromethods for study of protein and antibodies; procedure and general application of hemagglutination and hemagglutination—inhibition reactions with tannic and protein treated red blood cells. J. Immunol., 72 : 360—367.

Weinbach R. 1958. Die Verwendbarkeit formolbehandelter Eritrociten als Antigenträger in der indirecten Haemagglutination. Schweiz. Z. f. allgem. Pathol. u. Bakteriol., 21 : 1043—1046.

ON THE ANTIGENIC PROPERTIES OF MATERIAL FROM 1st AND 3d INSTAR LARVAE OF REINDEER WARBLE-FLY

K. A. Breyev and G. N. Obrezha

SUMMARY

The degree of identity of antigenic properties of haemolymph from 3d instar larvae and saline extract from newly hatched 1st instar larvae of *Oedemagena tarandi* was determined by Boyden—Stavitsky method of passive hemagglutination. The blood serum of guinea pigs, which were injected with haemolymph from 3d instar larvae, was employed as antiserum. With 8.2 ppm protein concentration the solution of haemolymph fully inhibited the ability of the antiserum, specific to this antigen, to agglutinate the erythrocytes treated with haemolymph of 3d instar larvae. The extract from 1st instar larvae didn't inhibit hemagglutination even with 1050 ppm protein concentration. In evaluating the results obtained and in carrying further investigation on immunity to warble-flies larvae it should be taken into account that antigenic properties of material from 1st and subsequent instar larvae are likely not identical.